製品コード RR241A

食品・環境分析用

TaKaRa

Enterobacteriaceae (*rplP* gene) Quantitative PCR Kit

説明書

v201308Da

本製品は、リアルタイム PCR により *rplP* (50S ribosomal protein L16) 遺伝子を検出対象として腸内細菌科菌群を検出および定量するためのキットです。4 日以上の日数を要する培養法に比べて迅速に結果を得ることができ、食品・環境分野の自主管理等に有用です。

リアルタイム PCR 法について

リアルタイム PCR は、PCR 増幅の過程を蛍光物質によりリアルタイムでモニタリングする迅速性と定量性に優れた遺伝子検出法です。本製品に含まれる SYBR® *Premix Ex Taq* GC は、SYBR® Green I を用いたインターカレーター法によるリアルタイム PCR 試薬で、GC 含量が高い配列でも良好に増幅できるため広範な細菌種の検出に適しています。

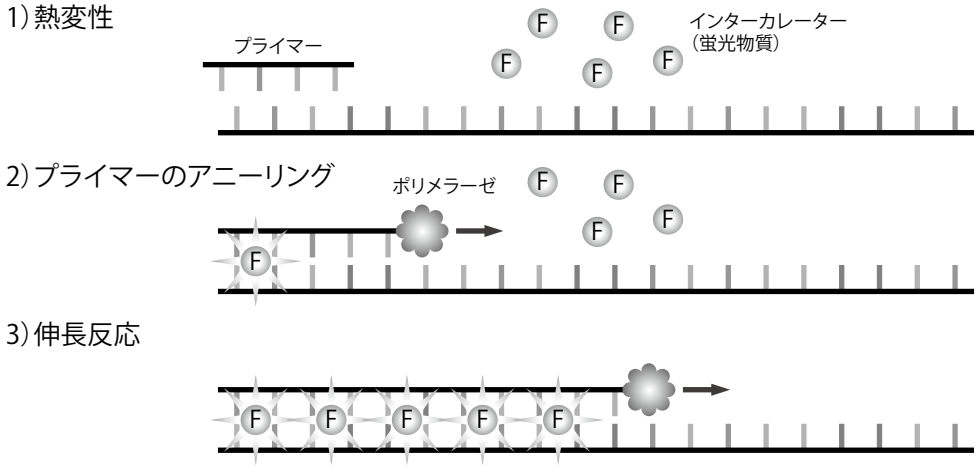


図 1. インターカレーター法の原理

二本鎖 DNA に結合することで蛍光を発する試薬（インターカレーター）を反応液に加え、増幅に伴う蛍光を検出する方法です。PCR 反応によって合成された二本鎖 DNA にインターカレーターが結合すると、蛍光を発します。

※ 本キットの開発には、東京海洋大学 木村凡先生、高橋肇先生にご協力いただきました。

I. キットの内容（25 μl 反応、100 回分）

1.	SYBR® *Premix Ex Taq* GC＊1	2 × conc.	625 μl × 2
2.	rplP Primer Mix	5 × conc.	250 μl × 2
3.	dH_2O		1 ml
4.	ROX Reference Dye＊2	50 × conc.	50 μl
5.	ROX Reference Dye II＊2	50 × conc.	50 μl
6.	rplP Positive Control	1 × 10^5 copies/μl	100 μl
7.	EASY Dilution (for Real Time PCR)		1 ml × 2

＊1： *TaKaRa Ex Taq* HS、dNTP Mixture、Mg^{2+}およびSYBR® Green Iを含む。

＊2： Life Technologies社製リアルタイムPCR装置など、ウェル間の蛍光シグナルの補正を行う装置で解析する場合に使用します。StepOnePlus™ Real-Time PCR SystemにはROX Reference Dyeを、7500 Real-Time PCR Systemおよび7500 Fast Real-Time PCR SystemにはROX Reference Dye IIを用いてください。Thermal Cycler Dice Real Time System *II*および*Lite*では必要ありません。

II. 輸送と保存

輸送　－ 20℃ / － 80℃

保存　SYBR® *Premix Ex Taq* GC（Package1）

4℃保存：6 ヵ月安定（長期保存は－ 80℃）
必ず遮光して保存してください。また、4℃保存する場合には、コンタミネーションに十分注意してください。

※ 長期保存する際は、－ 80℃で保存してください。
（－ 20℃保存は避けてください。）いったん融解したものは 4℃で保存し、6 ヵ月を目処にご使用ください。

その他のコンポーネント（Package2）

－ 20℃保存

III. キット以外に必要な機器、試薬（主なもの）

＜サンプル懸濁液調製に必要なもの＞

BPW（ペプトン水）
ストマッカーおよびストマッカー袋

＜ DNA 抽出に必要なもの＞

NucleoSpin® Tissue（製品コード 740952.10/.50/.250）
特級エタノール（＞ 99%）
ヒートブロック（56℃および 70℃で使用可能なもの）
マイクロピペット
マイクロピペット用チップ（疎水性フィルター付）
微量高速遠心機

＜リアルタイム PCR に必要なもの＞

リアルタイム PCR 用増幅装置および専用チューブ
Thermal Cycler Dice Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）
Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System（Life Technologies 社）
StepOnePlus™ Real-Time PCR System（Life Technologies 社）など

卓上遠心器
マイクロピペット
マイクロピペット用チップ（疎水性フィルター付）

IV. 使用上の注意

本キットを使用する際の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

[使用に際して]

1. 使用目的：本キットは食品・環境分析に使用する製品です。

2. 測定結果：本キットは遺伝子検出であるため、死菌も検出されます。従って、生菌のみの検出結果が必要な場合は、培養法による検査も行い、結果を判定してください。（検査結果判定により発生する問題に関してタカラバイオ株式会社は、一切の責任を負いません。）

3. 廃棄：　試料は感染性を有するものとして、各施設の安全規定に従って廃棄してください。作業区域は常に清潔に保ち、検体または検査に用いた器具等は高圧蒸気滅菌器を用いて 121℃で 20 分間以上加熱滅菌処理、または 2.5% 次亜塩素酸ナトリウム液で処理を行った上、各施設の感染性廃棄処理マニュアルに従って処理してください。試薬を廃棄する際は多量の水で流してください。プラスチック、ろ紙の試薬容器ならびに器具は、廃棄物の処理および清掃に関する法律に従って処理してください。

[操作上の注意]

1. SYBR® *Premix Ex Taq* GC は、泡立てないように緩やかに転倒混和し、試薬を均一にしてから使用してください。試薬組成に偏りがあると十分な反応性が得られなくなります。ボルテックスによる混合は行わないでください。
   なお、SYBR® *Premix Ex Taq* GC を－ 80℃で保存した場合、保存中に白色～黄白色の沈殿が生じることがあります。軽く手で温めるか、遮光して室温にしばらく置いた後、転倒混和することで完全に溶解します。沈殿が生じたままでは、試薬組成に偏りができますので、必ず均一に混合してからご使用ください。

2. 反応液調製時には、試薬を氷上に置いてください。

3. SYBR® *Premix Ex Taq* GC は、SYBR® Green I を含んでいます。反応液調製時に強い光を当てないよう注意してください。

4. 反応液の調製から検出まで、次の 3 つのエリアを設定し、物理的に隔離することを推奨します。各エリアにおいては、増幅産物の入ったチューブの開閉は避けてください。

   ○エリア 1：反応液の調製、分注を行います。
   ○エリア 2：検体の調製を行います。
   ○エリア 3：検体の反応液への添加と、反応および検出を行います。

   本キットでは増幅反応と検出を同時にリアルタイムで行うため、反応終了後の増幅産物を電気泳動などに使用する必要はありません。また、コンタミネーション発生の原因となりますので、増幅産物をチューブから取り出すことはおやめください。

V. 操作

操作の概要

サンプル懸濁液の調製

検体 10 g ＋ BPW（ペプトン水）90 ml
↓
ストマッカー処理
↓

DNA 抽出

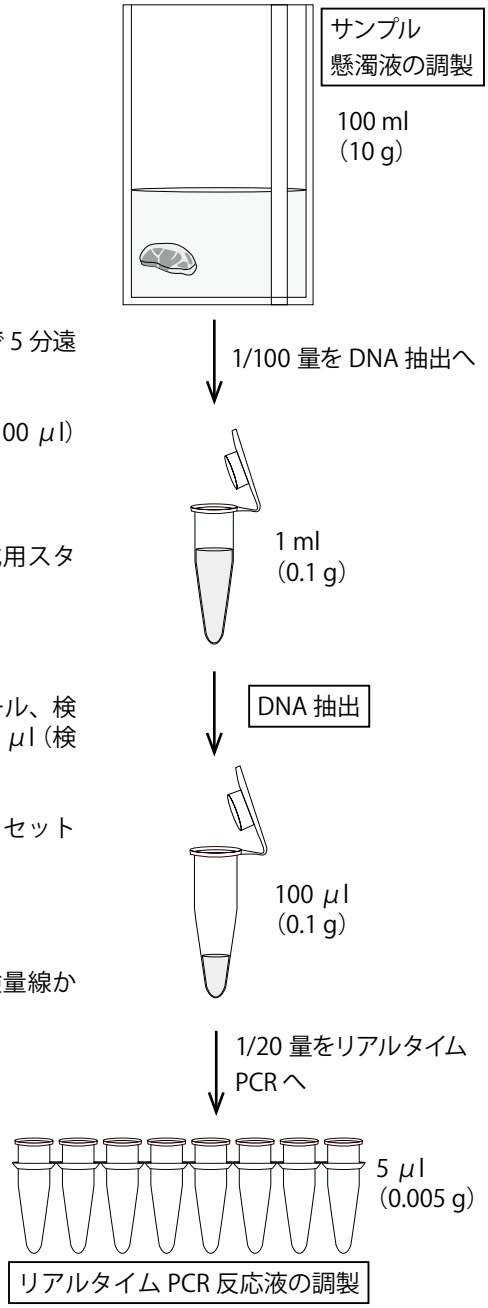
試料原液 1 ml（検体 0.1 g 相当量）を 8,000 × *g* で 5 分遠心し、上清を除去する。
↓
NucleoSpin® Tissue による DNA 抽出（最終液量 100 µl）
↓

リアルタイム PCR 反応液の調製と反応開始

rplP Positive Control を段階希釈し、検量線作成用スタンダードを調製する。
↓
反応液を調製する。
↓
反応液を反応チューブに分注し、陰性コントロール、検量線作成用スタンダード、または検体サンプル 5 µl（検体 0.005 g 相当量）を添加する。
↓
反応チューブをリアルタイム PCR 用増幅装置にセットし反応を開始する。
↓

定量解析

リアルタイム PCR 装置の解析ソフトにより、検量線から検体サンプルの定量結果が算出される。



V-1. サンプル懸濁液の調製（エリア 2 で実施）

検体 10 g に 90 ml の BPW（ペプトン水）を加え、必要に応じてストマッカー処理等を行ったものを試料原液とする。

1. 検体を 10 g 秤量し、ストマッカー袋等へ移す。
2. 検体の 9 倍量に相当する 90 ml の BPW を加える。
3. 必要に応じてストマッカー等を用いてホモジネートしたものを試料原液とする。

＊ 培養法による菌数測定を並行して行う場合には、上記の方法で調製したサンプル懸濁液を 10℃、2 時間培養することにより損傷菌が回復し、より正確な菌数測定が可能になります。

V-2. DNA 抽出（エリア 2 で実施）

試料原液 1 ml を 8,000 × *g* で 5 分間遠心し、上清を除去する。NucleoSpin® Tissue の細菌用プロトコールに従って DNA 抽出を行い、100 μl で溶出する。

1. 試料原液 1 ml を 1.5 ml マイクロチューブに分取する。
2. 8,000 × *g* で 5 分間遠心し、上清を除去する。
3. Buffer T1 180 μl、Proteinase K[*1] 溶液 25 μl を細菌のペレットに添加し、激しく撹拌する。
4. 56℃で 1 ～ 3 時間（または一晩）完全に溶解するまでインキュベートする。
5. サンプルを撹拌する。Buffer B3 200 μl を加えて、激しく撹拌した後、70℃で 10 分間インキュベートする。不溶物が残る場合は、11,000 × *g*、5 分間遠心し、上清を新しいチューブに移す。
6. エタノール（> 99%）210 μl を添加し、よく混合する。
7. NucleoSpin® Tissue Column を Collection Tube にセットする。6. の溶液をカラムに添加し、11,000 × *g*、1 分間遠心する。ろ液を捨てた後、同じ Collection Tube にカラムをセットする。
8. <u>1 回目の洗浄</u>：
   Buffer BW 500 μl をカラムに添加し、11,000 × *g*、1 分間遠心する。
   ろ液を捨てた後、同じ Collection Tube にカラムをセットする。
   <u>2 回目の洗浄</u>：
   Buffer B5[*2] 600 μl をカラムに添加し、11,000 × *g*、1 分間遠心する。
   ろ液を捨てた後、同じ Collection Tube にカラムをセットする。
9. カラムを 11,000 × *g*、1 分間遠心する。
10. カラムを 1.5 ml マイクロチューブ（各自で用意）にセットする。70℃に温めた Buffer BE 100 μl を加え、室温で 1 分間インキュベートした後、11,000 × *g*、1 分間遠心する。溶出した DNA 溶液は 4℃で保存する。（長期保存の場合はー 20℃で保存し、凍結融解はできるだけ繰り返さない。）

＊ 1：Proteinase K 溶液の調製法

<u>製品コード 740952.10 の場合：</u>

Proteinase K（凍結乾燥品）6 mg に Proteinase Buffer PB 260 μl を加えて完全に溶解する。調製した Proteinase K 溶液は、ー 20℃で保存する (6 ヵ月安定)。

＊ 2：Buffer B5 の調製法

<u>製品コード 740952.10 の場合：</u>

Wash Buffer B5（concentrate）4 ml に、エタノール（96 ～ 100%）16 ml を添加する。

V-3. リアルタイム PCR

V-2 で調製した DNA 溶液の内、5 μl を鋳型としてリアルタイム PCR を行う。同時に検量線作成用スタンダードの反応を実施する。

1. 検量線作成用スタンダードの調製（エリア 3 で実施）

   rplP Positive Control を EASY Dilution で段階希釈し、検量線作成用スタンダードとする。（リアルタイム PCR には、1 反応当りそれぞれ 5 μl を使用する。）

   (1) 1×10^5 copies/μl（rplP Positive Control 原液）
   (2) 1×10^4 copies/μl（rplP Positive Control 原液 5 μl ＋ EASY Dilution 45 μl）
   (3) 1×10^3 copies/μl（2. の 1×10^4 copies/μl 溶液 5 μl ＋ EASY Dilution 45 μl）
   (4) 1×10^2 copies/μl（3. の 1×10^3 copies/μl 溶液 5 μl ＋ EASY Dilution 45 μl）

   リアルタイム PCR を実施する際に、スタンダードの値を copies/g の単位で入力しておくと、反応終了後、定量値を検体 1 g 当りのコピー数として得ることができる。（定量の原理等については「VI. 定量解析」の項を参照のこと）

   表 1. copies/tube と copies/g の対応表

	copies/tube （1 反応当りのコピー数）	copies/g （検体 1g 当りのコピー数）
1	5×10^5	1×10^8
2	5×10^4	1×10^7
3	5×10^3	1×10^6
4	5×10^2	1×10^5

2. 反応液の調製（エリア 1 で実施）

   下記に示す反応液を氷上で調製する。
   鋳型以外のコンポーネントを必要本数＋α分調製し、各反応チューブに 20 μl ずつ分注して軽くキャップをしめる。その内の 1 本に陰性コントロールとして滅菌水 5 μl を加え、反応チューブのキャップをしっかり閉める。

   【Thermal Cycler Dice Real Time System の場合】

	[1 反応]
SYBR® *Premix Ex Taq* GC（2 × conc.）	12.5 μl
rplP Primer Mix（5 × conc.）	5.0 μl
dH_2O	2.5 μl
鋳型	（5.0 μl）
	25.0 μl

   【Life Technologies 社製リアルタイム PCR 装置の場合】

	[1 反応]
SYBR® *Premix Ex Taq* GC（2 × conc.）	12.5 μl
rplP Primer Mix（5 × conc.）	5.0 μl
ROX Reference Dye or ROX Reference Dye II＊	0.5 μl
dH_2O	2.0 μl
鋳型	（5.0 μl）
	25.0 μl

   ＊： StepOne Plus™ には ROX Reference Dye を、7500 Fast Real-Time PCR System には ROX Reference Dye II を使用する。

3. 鋳型（DNA 溶液）の添加（エリア 3 で実施）

2. で分注した反応液に、検体 DNA 溶液や検量線作成用スタンダード等の鋳型を 5 μl 添加し、チューブのキャップをしっかり閉める。
蛍光測定を行うため、チューブに汚れが付かないよう注意し、キャップを閉めるときは手袋を着用する。0.2 ml チューブ用の卓上遠心器で軽く遠心を行い、リアルタイム PCR 増幅装置にセットする。

4. リアルタイム PCR 反応の開始

以下の PCR 条件でリアルタイム PCR を実施する。

※リアルタイム PCR 増幅装置の操作方法は、各機種の取扱説明書をご参照ください。

初期変性
　95℃　30 秒
2 Step PCR
　35 サイクル
　95℃　5 秒
　60℃　30 秒（蛍光検出：FAM/SYBR®）
融解曲線分析

VI. 定量解析

VI-1. 定量の原理

rplP Positive Control について

本製品に含まれる rplP Positive Control は、*rplP* 遺伝子の該当領域を搭載したプラスミド DNA であり、OD_{260} 値より換算した値で 1×10^5 copies/μl に調整されています。段階希釈物を検量線作成用スタンダードとして使用し、定量解析を行うことができます。
（ただし、本キットは遺伝子検出用キットであるため、死菌の遺伝子も検出されます。正確な生菌数が必要な場合は、培養法による検査も行う必要があります。）

検体 1 g 当りのコピー数への換算

本製品の説明書に従って操作すると、リアルタイム PCR へは検体 0.005 g 相当量を使用することになりますので、その値を 200 倍すると検体 1 g 当りのコピー数となります。

検体 10 g ＋希釈水 90 ml
　↓　ストマッカー処理
試料原液 1 ml（検体 0.1 g 相当量）
　↓　DNA 抽出
DNA 溶液 100 μl（検体 0.1 g 相当量）
　↓　1/20 をリアルタイム PCR へ
リアルタイム PCR に使用 5 μl ／反応（検体 0.005 g 相当量）

VI-2. 定量解析の手順

検体 1 g 当りのコピー数として定量する方法（標準）

1. スタンダードの値を copies/g 単位で入力する。
2. 定量結果は、検体 1 g 当りのコピー数（copies/g）として表示される。

1 反応当りのコピー数として定量し、検体 1 g 当りのコピー数に換算する方法（オプション）

1. スタンダードの値を copies/tube 単位で入力する。
2. 定量結果は、1 反応当りのコピー数（copies/tube）として表示される。
3. 検体 1 g 当りのコピー数（rplP Positive Control 相当数）を算出する。
   定量値× 200 ＝検体 1 g 当りのコピー数（copies/g）

VI-3. コピー数と菌数の相関について

純培養菌の場合

以下の 5 種類の菌株を TSB 培地で一晩培養し、生理食塩水でそれぞれ段階希釈して TSA 培地への塗沫培養により生菌数を求めた。また、各希釈段階の菌液 1 ml を分取し、本製品の説明書に従いリアルタイム PCR 解析を実施した。

供試菌株
- *Proteus mirabilis* JCM 1669
- *Klebsiella pneumoniae* IAM 1063
- *Citrobacter freundii* IAM 12471
- *Enterobacter aerogenes* IAM 1183
- *Escherichia coli* IAM 1137

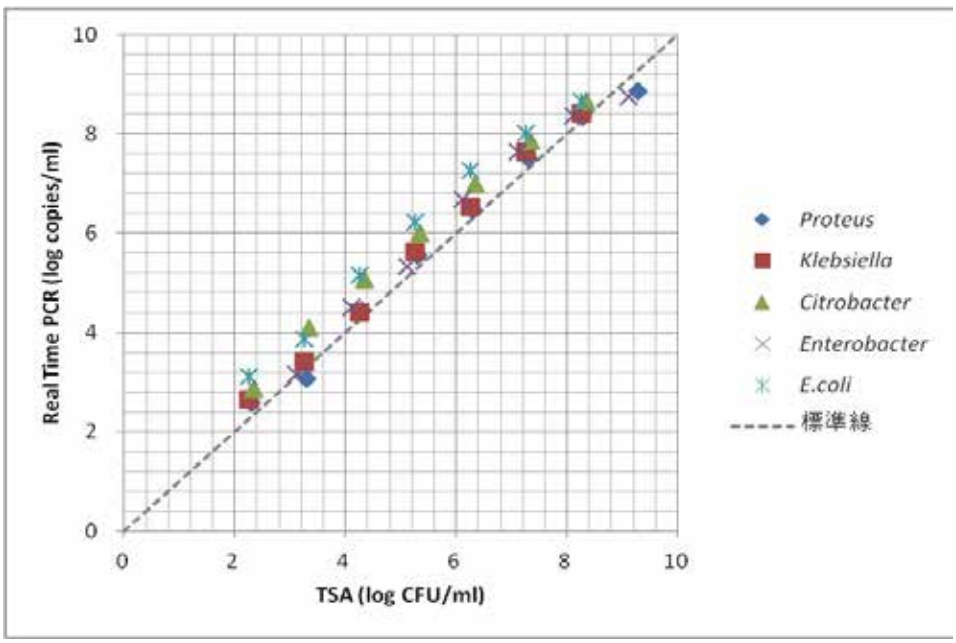


図 2. コピー数と菌数の相関（純培養菌）

TSA 塗沫培養の結果（菌数；CFU/ml）を横軸に、リアルタイム PCR の結果（コピー数；copies/ml）を縦軸にプロットした。TSA 塗沫培養とリアルタイム PCR の結果はよく相関し、コピー数の方がわずかに高めに算出される傾向にあったが、その差異はほぼ 1 オーダー以内に収まった。

実検体の場合

肉類 6 種、野菜類 5 種、サラダ類 5 種につき、生理食塩水または BPW を用いて 10% 懸濁液を調製し、VRBG 混釈培養（37℃、48 ～ 96 時間）による菌数測定と本製品によるリアルタイム PCR 解析を実施した。

表 2. コピー数と菌数（実検体）

	qPCR [log copies/g]	VRBG [log CFU/g]
鶏挽き肉	3.44	2.74
手羽先肉	5.03	4.48
手羽先肉	5.52	4.96
豚小間切れ肉	3.17	1.70
豚挽肉	3.89	2.49
牛肩ロース	3.32	1.60
かいわれ大根	6.33	4.52
かいわれ大根 *	6.75	7.04
小松菜	3.59	3.09
小松菜 *	3.94	4.65
もやし *	7.35	6.79
大根サラダ	5.45	3.38
大根サラダ *	3.84	3.33
オニオンサラダ	5.50	3.80
ベービーリーフ	7.12	6.58
キャベツミックスサラダ *	4.87	3.50

＊：10% 懸濁時に BPW を使用（その他は、生理食塩水を使用）。

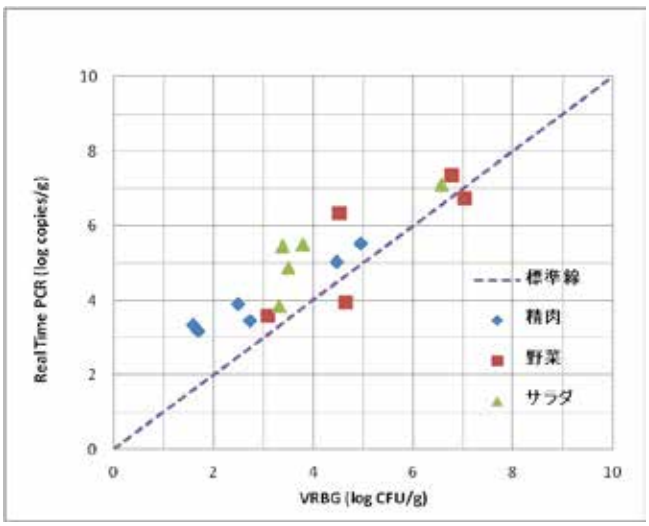


図 3. コピー数と菌数の相関（実検体）

VRBG 混釈培養の結果（菌数；CFU/g）を横軸に、リアルタイム PCR の結果（コピー数；copies/g）を縦軸にプロットした。VRBG 混釈培養とリアルタイム PCR の結果はよく相関し、コピー数の方が菌数よりも 1 ～ 2 オーダー高めに算出される傾向にあった。その原因としては、VRBG は胆汁末などの選択剤を含む培地であるため、殺菌工程などで損傷を受けた細菌がうまく培養されない可能性が考えられる。そこで、10% 懸濁液調製の際に、生理食塩水の代わりに BPW を用いることにより損傷回復を試みたところ（表 2 の＊印の検体）、VRBG 混釈培養とリアルタイム PCR の結果がほぼ一致した。

VII. 検出可能な菌種について

腸内細菌科菌群 12 種および非腸内細菌科菌群 19 種を用いて、本製品に用いられているプライマーの特異性を PCR 法により確認した結果、腸内細菌科菌群のみが検出され、非腸内細菌科菌群は検出されなかったことから、腸内細菌科菌群に特異的であることが確認されました。

VIII. 関連製品

SYBR® *Premix Ex Taq*™ GC（製品コード RR071A/B）
Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）
NucleoSpin® Tissue（製品コード 740952.10/.50/.250）
Bacteria (*tuf* gene) Quantitative PCR Kit（製品コード RR240A）

IX. 注意

- 本製品は食品分析および環境分析用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。検査結果判定により発生する問題に関してタカラバイオ株式会社は一切の責任を負いません。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する最新の情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- 本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

[L11] SYBR® Green I
This product is covered by the claims of U.S. Patent No. 5,436,134 and 5,658,751 and their foreign counterpart patent claims.
Takara PCR products containing SYBR® Green I are sold under license from Molecular Probes Inc. only for the usage in Real-time PCR for internal research purpose. These products are not to be used for the purpose such as; providing medical, diagnostic, or any other testing, analysis or screening services or providing clinical information or clinical analysis in return for compensations.

[L15] Hot Start PCR
Licensed under U.S. Patent No. 5,338,671 and 5,587,287 and corresponding patents in other countries.

[L46] SYBR®/Melting Curve Analysis
The purchase of this product includes a limited, non-transferable license for all fields other than human or veterinary in vitro diagnostics under specific claims of U.S. Patent Nos. 6,174,670, 6,569,627 and 5,871,908, owned by the University of Utah Research Foundation or Evotec Biosystems GmbH and licensed to Idaho Technology, Inc. and Roche Diagnostics GmbH, to use only the enclosed amount of product according to the specified protocols. No right is conveyed, expressly, by implication, or by estoppel, to use any instrument or system under any claim of U.S. Patent Nos. 6,174,670, 6,569,627 and 5,871,908, other than for the amount of product contained herein.

[L52] Rox Reference Dye (Research Field)
Use of this product is covered by one or more of the following US patents and corresponding patent claims outside the US: 5,928,907. The purchase of this product includes a limited, non-transferable immunity from suit under the foregoing patent claims for using only this amount of product for the purchaser's own internal research. No right under any other patent claim and no right to perform commercial services of any kind, including without limitation reporting the results of purchaser' s activities for a fee or other commercial consideration, is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. This product is for research use only. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

[L60] Intestinal bacteria PCR Detection
Licensed under the pending JP patent application No.2012-35637.

[M57] LA Technology
This product is covered by the claims 6-16 outside the U.S. corresponding to the expired U.S. Patent No. 5,436,149.

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-543-6116 Fax 077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/
タカラバイオ株式会社